



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mateja Tkalčević

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**KATABOLIZAM MONOAMINSKIH
NEUROTRANSMITERA**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka PMF-a

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

8. lipnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

12. srpnja 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| § SAŽETAK..... | VI |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. MONOAMIN-OKSIDAZA..... | 3 |
| 2.1. Monoamin-oksidaza - MAO..... | 3 |
| 2.1.1. Katalitička reakcija MAO..... | 4 |
| 2.1.2. Struktura i izoenzimi monamin-oksidaže | 7 |
| 2.1.3. Supstratna specifičnost monoamin-oksidaza | 12 |
| § 3. PATOGENEZA PARKINSONOVE BOLESTI | 14 |
| 3.1.1. Oksidativni stres u Parkinsonovoj bolesti..... | 14 |
| 3.1.2. α -sinuklein i parkin | 18 |
| 3.1.3. Lewy-tijelo..... | 20 |
| § 4. INHIBITORI MONOAMIN-OKSIDAZE I PRISTUP LIJEČENJU PARKINSONOVE BOLESTI..... | 21 |
| 4.1.1. Cheese efekt..... | 22 |
| 4.1.2. L-deprenil i rasagilin – ireverzibilni inhibitor MAO B..... | 24 |
| 4.1.3. Selektivni reverzibilni inhibitori MAO-A u Parkinsonovoj bolesti i depresiji | 26 |
| § 5. LITERATURNI IZVORI..... | 28 |

§ Sažetak

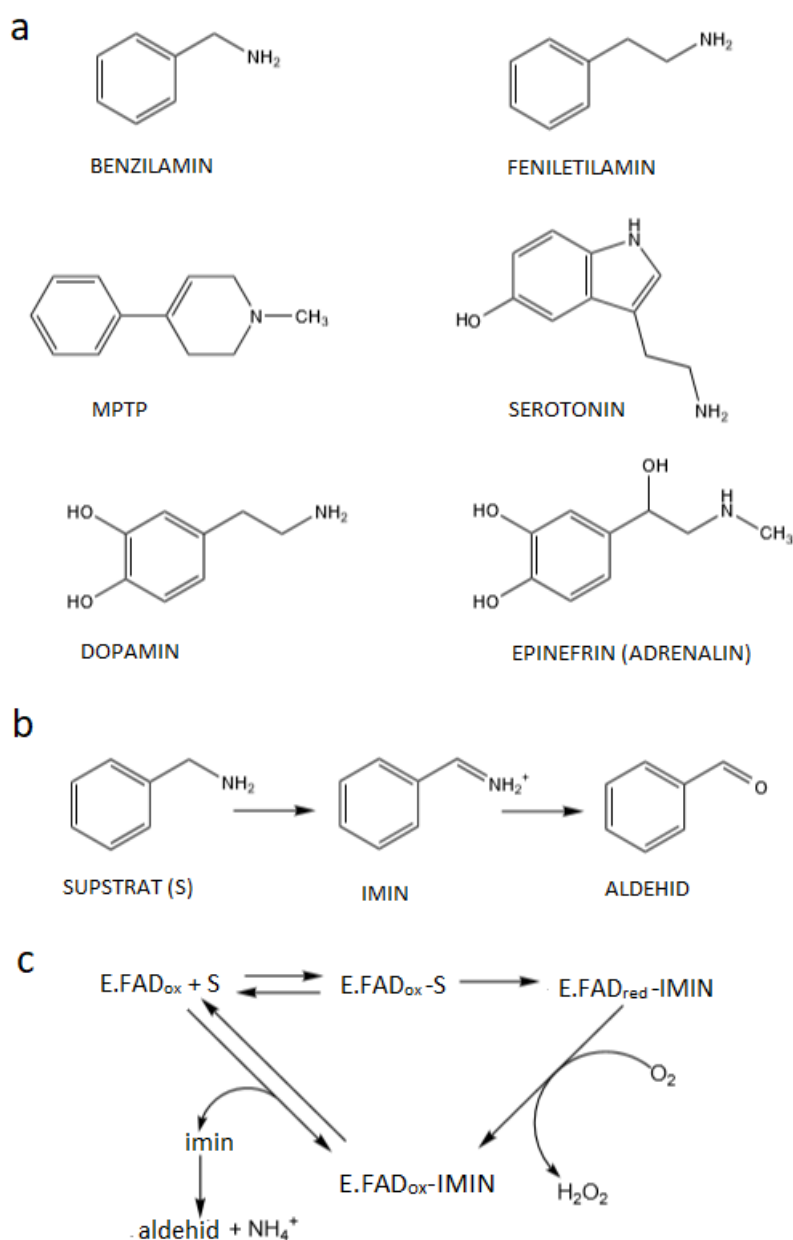
Monoamini ili biogeni amini su kemijski spojevi koji se ubrajaju u skupinu neuroprijenosnika, tvari koje sudjeluju u prijenosu živčanog impulsa, a nastaju dekarboksilacijom određenih aminokiselina. Najpoznatiji biogeni amini u ljudskom organizmu jesu noradrenalin, adrenalin, serotonin, histamin i dopamin koji imaju različite biološke uloge, a sve su presudne za normalno funkcioniranje živih organizama. Metabolizam monoamina kao i metabolizam ostalih bioloških molekula strogo je reguliran te vrlo kompleksan, a od posebnog interesa u ovom radu jest reakcija oksidativne deaminacije monoaminskih neurotransmitera, detaljnije objašnjena na primjeru dopamina.

Nedovoljne koncentracije dopamina karakteristične su za Parkinsonovu bolest, tešku neurodegeneracijsku progresivnu bolest koja pogađa velik dio populacije od koje posebno starije uzraste. Glavni uzrok bolesti još uvijek nije otkriven, a sukladno tome ni lijek, no predloženi su razni mehanizmi koji mogu objasniti povezanost različitih potencijalnih uzroka bolesti te potencijalni lijekovi poput inhibitora MAO, enzima monoamin-oksidade koji ima važnu ulogu u metabolizmu monoamina što će se detaljnije spominjati u radu.

Od otkrića monoamin-oksidade ranih godina 20. stoljeća do danas, otkriven je velik broj lijekova koji ublažavaju simptome te usporavaju progresivnost Parkinsonove bolesti, no i dalje se radi na pronalaženju glavnog uzroka bolesti koji bi omogućio velik napredak u liječenju oboljelih od Parkinsona i sličnih neurodegeneracijskih bolesti.

§ 1. UVOD

Nedostatak dopamina povezuje se s Parkinsonovom bolesti, progresivnom neurodegeneracijskom bolesti s teškim simptomima poput nekontroliranih tremora, sporim pokretanjem tijela, rigidnošću, posturalnom neravnotežom^[1]. Iako točan mehanizam nastanka bolesti nije poznat kao najvjerojatniji uzrok smatra se smanjena proizvodnja dopamina zbog oštećenja neurona koji proizvode dopamin (dopaminergički neuroni) koji se nalaze u nigrostrijatalnim područjima mozga (*substantia nigra*)^[1]. Dopamin je kemijski spoj koji djeluje kao neuroprijenosnik u središnjem i perifernom živčanom sustavu nužan za kontrolu voljnih i nesvjesnih pokreta, luči ga hipotalamus, a sintetizira se direktno iz *L*-tirozina ili *L*-fenilalanina^[2]. U organizam se može unijeti i prehranom, no budući da ne može proći krvno-moždanu barijeru mora se sintetizirati i izravno u mozgu. Izrazito je važan kemijski spoj, od same uloge neurotransmitera/neuroprijenosnika do prekursora za sintezu ostalih hormona i neurotransmitera norepinefrina i adrenalina. Razgradnja dopamina odvija se djelovanjem enzima monoamin-oksidge koji je otkrila 1928. godine Mary Hare Bernheim, britanska biokemičarka koja je enzim nazvala tirozin-oksidge, a ime monoamin-oksidge dodijelio je 20-ak godina kasnije znanstvenik Hugh Blaschko koji je uočio da su enzimi tirozin-oksidge, noradrenalin-oksidge i alifatska amin-oksidge zapravo jednaki i da se radi o enzimu koji može katalizirati reakcije metabolizma isključivo primarnih, sekundarnih i tercijarnih amina dok diamini nisu supstrati enzima monoamin-oksidge (MAO)^[3]. Prilikom razgradnje dopamina pod djelovanjem enzima MAO nastaje vodikov peroksid koji pri malim koncentracijama nije opasan za stanice, no u većim koncentracijama postaje opasan za mozak i organizam općenito zbog mogućnosti nespecifične oksidge tvari te se djelovanjem enzima katalaze i superoksid-dismutaze u mozgu pretvara u vodu i kisik. Ukoliko enzimi koji prevode H_2O_2 u H_2O i O_2 nisu aktivni ili je na neki drugi način postignuta neravnoteža između nastajanja i uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (peroksida, superoksida, hidroksidnih radikala itd.) dolazi do pojave oksidativnog stresa koji konačno može uzrokovati odumiranje dopaminergičkih neurona.



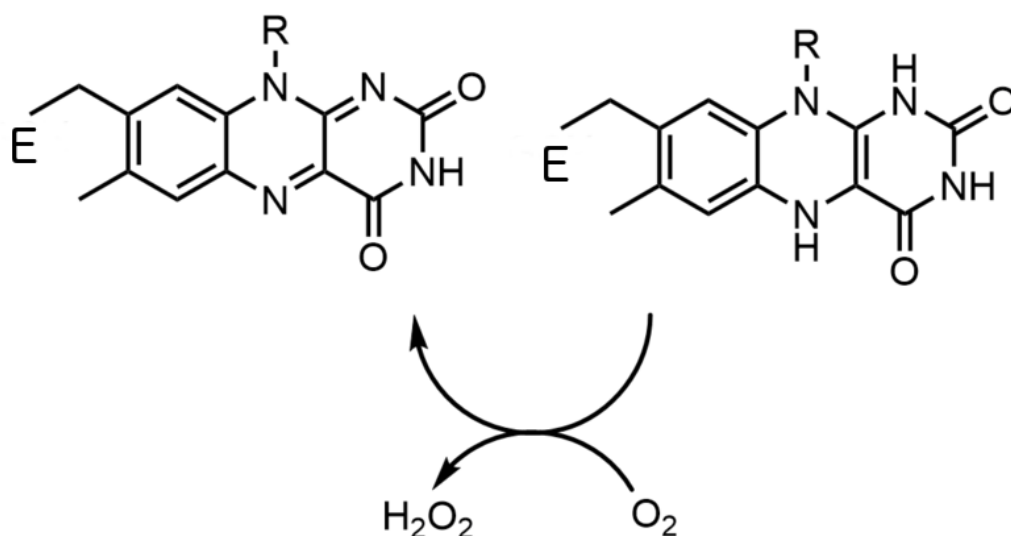
Slika 1. A) Supstrati enzima monoamin-oksidade. Svi supstrati prikazani na slici su monoamini. B) Prikaz reaktanta, međuprodukta i konačnog produkta reakcije koju kataliziraju MAO. C) Shematski prikaz pretvorbe supstrata do aldehida i amonijevih iona preko međuprodukta imina reakcijom koju kataliziraju enzimi MAO.

Slika je preuzeta iz rada "Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders" i dorađena.

§ 2. MONOAMIN-OKSIDAZA

2.1. Monoamin-oksidaza - MAO

Monoamin-oksidaze su enzimi iz skupine flavoenzimskih oksidaza (enzimi koji imaju flavin adenin dinukleotid kao prostetičku skupinu) koje koriste kisik kao akceptor elektrona pri čemu kataliziraju reakciju oksidacije amina u dva koraka i generiraju vodikov peroksid kao produkt^[4]. Supstrati tih enzima jesu isključivo monoamini poput primarnih amina dopamina, serotonina, norepinefrina te biogeni amini koji se nalaze u hrani poput tiramina i feniletilamina^[4]. One ne prepoznaju diamine kao supstrate što je primijetio već spomenuti znanstvenik Hugh Blaschko. Aktivnost monoamin-oksidaza smatra se ključnom za normalni razvoj i funkcioniranje mozga te su opažene negativne posljedice u osoba sa smanjenom ekspresijom enzima poput promjena u raspoloženju te sklonosti ovisnostima^[5]. Monoamin-oksidaze koriste flavin adenin dinukleotid, vrlo važan oksidacijsko-redukcijski kofaktor koji sudjeluje u brojnim metaboličkim reakcijama, a postoji u oksidiranom i reduciranom obliku što je prikazano na slici 2. Njegova uloga je prijenos elektrona prilikom oksidacije supstrata: ukoliko se supstrat reakcije oksidira, FAD će biti akceptor hidridnog iona i protona te se reducirati do FADH₂. Taj reducirani kofaktor će se zatim oksidirati uz pomoć kisika kako bi se regenerirao FAD koji može ući u novi katalički ciklus.



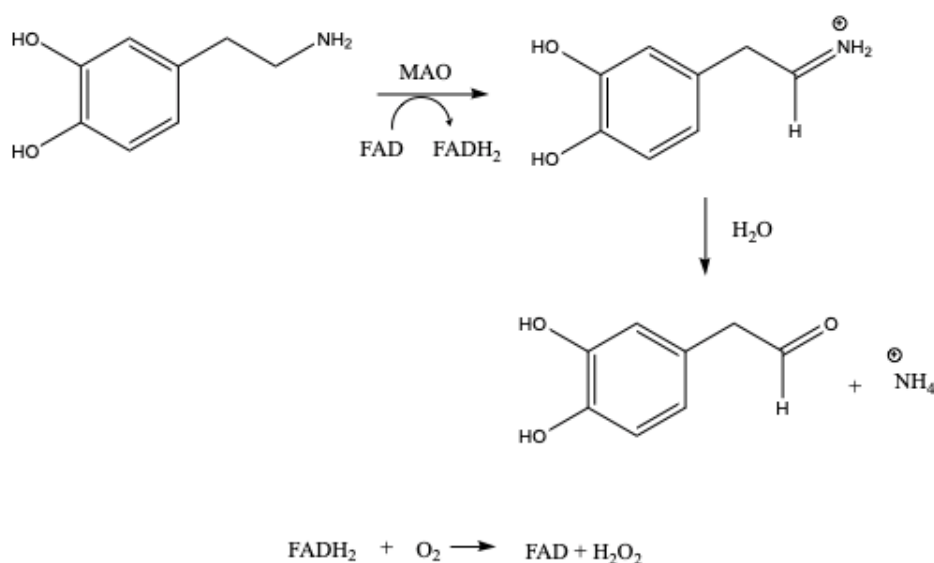
Slika 2. Oksidacija reduciranog kofaktora FADH_2 do oksidiranog kofaktora FAD uz pomoć supstrata kisika. Konačni produkt reakcije oksidacije FADH_2 kisikom jest vodikov peroksid.

Monoamin-oksidaze dolaze u obliku dva izozima MAO A i MAO B pri čemu je MAO A monomer, a MAO B dimer te se posebno razlikuju prema supstratnoj specifičnosti i različito su rasprostranjeni od tkiva od tkiva. Više o strukturi napisano je u poglavlju 2.1.2. Razina enzima MAO A i MAO B razlikuje se kod novorođenčadi, MAO A je inicijalno eksprimiran u većini tkiva, a starenjem razina MAO B poraste otprilike 2-3 puta u neuronskim tkivima dok razina MAO A poraste čak devet puta u srčanim tkivima ^[4] što doprinosi neurodegeneracijskim i kardiodegeneracijskim bolestima koje su ovisne o dobi. U mozgu je MAO B većim dijelom prisutan u bazalnim ganglijima ^[4] dok se MAO A nalazi u nekim drugim dijelovima mozga u većoj mjeri nego MAO B. Primarna uloga MAO jest regulacija razine neurotransmitera u mozgu koji su po svojem sastavu biološki amini. Reakcija koju kataliziraju monoamin-oksidaze jest oksidativna deaminacija aaminskih neurotransmitera, a u ovom radu bit će opisana na primjeru supstrata dopamina.

2.1.1. Katalitička reakcija MAO

Monoamin-oksidaze kataliziraju reakciju oksidativne deaminacije monoaminskih neurotransmitera uz pomoć kofaktora FAD koji je važan sudionik reakcije. Reakcija se odvija u dva koraka; sastoji se od reduktivne i oksidativne polureakcije koje su međusobno povezane preko kofaktora FAD . U reduktivnoj polureakciji flavinski kofaktor FAD se reducira do FADH_2 prihvaćanjem hidrida sa supstrata (dopamina) koji se nalazi u aktivnom mjestu enzima i pritom

prevodi u odgovarajući imin. Nastali imin se otpušta iz aktivnog mjesta enzima te se u vodi neenzimatski hidrolizira do odgovarajućeg aldehida 3,4-dihidroksifenilacetaldehida – DOPAL koji je puno stabilnija kemijska vrsta, uz oslobađanje amonijevih iona. Budući da je FADH_2 sada u reduciranom obliku on se mora oksidirati u FAD kako bi mogao započeti novi katalitički ciklus. U tom dijelu reakcije kisik je odgovarajući akceptor elektrona koji se prevodi u vodikov peroksid i nastaje oksidirani oblik kofaktora FAD.



Slika 3. Katalitička reakcija enzima monoamin-oksidaze na primjeru supstrata dopamina. Prikazana su oba koraka reakcije. Oksidacija dopamina do imina uz redukciju kofaktora FAD te daljnja neenzimatska razgradnja imina do odgovarajućeg aldehida 3,4-dihidroksifenilacetaldehida (DOPAL) i konačno oksidacija reduciranog kofaktora FADH_2 do FAD^+ uz nastajanje vodikovog peroksida.

Vodikov peroksid koji nastaje oksidativnom deaminacijom dopamina nije jako reaktivna vrsta, ali nije ni potpuno bezopasan te se mora ukloniti iz mozga ili prevesti u manje reaktivne oblike. Mogući negativni efekti H_2O_2 jesu nespecifična oksidacija tiolnih skupina proteina do disulfida ili konačno sulfenskih kiselina te oksidacija metioninskih tioetera do odgovarajućih sulfoksida^[4] što utječe na strukturu i biološku funkciju proteina te može ozbiljno naštetiti organizmu.

Važnu ulogu u sprječavanju negativnih efekata H_2O_2 ima poseban enzim glutation-peroksidaza koji prevodi H_2O_2 u manje reaktivne vrste. Glutation-peroksidaza koristi reducirani glutation, tripeptid sastavljen od aminokiselina glicina, cisteina i glutamata i vodikov peroksid kao supstrate te ih prevodi u oksidirani glutation i vodu. GSSG-reduktaza zatim reducira oksidirani glutation koristeći NADPH kao donor elektrona pri čemu ga prevodi u reducirani glutation, supstrat glutation-peroksidaze te omogućava ponovni katalitički ciklus. Enzim glutation-peroksidaza i njegov supstrat glutation nalaze se u međumembranskom prostoru i citosolu mitohondrija^[4] te predstavljaju glavni put uklanjanja H_2O_2 u tom organelu koji nema katalazu, drugi enzim koji također prevodi H_2O_2 u manje reaktivnu vrstu koji će biti spomenut u radu.

Osim oksidativnog djelovanja vodikovog peroksida opisanog u prethodnom odlomku, vodikov peroksid nastao u reakciji oksidativne deaminacije dopamina, može se prevesti u vrlo reaktivne hidroksilne radikalne vrste u prisutnosti iona željeza što se naziva *Fentonovom reakcijom*^[6]



Vjerojatnost *Fentonove reakcije* povećana je u slučajevima kada je koncentracija enzima glutation-peroksidaze niska što dovodi do gomilanja vodikovog peroksida koji se ne može ukloniti iz stanica te reagira s dostupnim ionima željeza i uzrokuje nastanak reaktivnih radikala. Niske koncentracije enzima glutation-peroksidaze u mozgu karakteristične su za Parkinsonovu bolest^[3]. Takve radikalne vrste vrlo su opasne jer će reagirati sa svim kemijskim vrstama koje se nalaze u neposrednoj blizini vrsta nastalih *Fentonovom reakcijom* te dovesti do vrlo ozbiljnih posljedica. Hidroksilni radikali reagiraju sa svim molekulama i oštećuju lipide, proteine i DNA^[4] te uzrokuju povećanje oksidativnog stresa - neravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta i njihovog uklanjanja pomoću antioksidacijskih sistema. Konačno povećani oksidativni stres dovodi do odumiranja neurona, živčanih stanica koje se ne mogu regenerirati. Više o mehanizmu nastajanja oksidativnog stresa povezanom s Parkinsonovom bolesti te uklanjanju reaktivnih kisikovih vrsta nalazi se u poglavlju 3. Patogeneza Parkinsonove bolesti

2.1.2. Struktura i izoenzimi monoamin-oksidaže

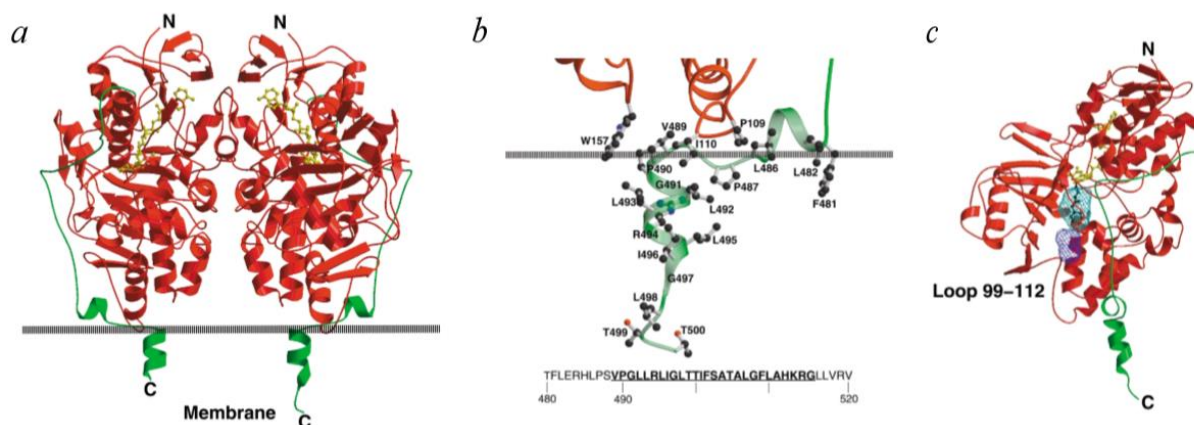
Monoamin-oksidaže dolaze u obliku dva izoenzima MAO A (monoamin-oksidaža A) i MAO B (monoamin-oksidaža B). Izoenzimi su po definiciji enzimi čiji je aminokiselinski slijed različit (razlikuju se po primarnoj strukturi), ali kataliziraju istu kemijsku reakciju.

Prvo je riješena kristalna struktura enzima MAO B, zatim MAO A te će u radu naglasak biti na strukturi izoenzima MAO B koji je važniji za proučavanje Parkinsonove bolesti jer je u većoj količini prisutan u regiji mozga koja je odgovorna za proizvodnju dopamina. Proučene su kristalne strukture enzima MAO B izoliranog iz ljudskog organizma te MAO A izoliranog iz štakora te su detaljnom analizom ustanovljene glavne razlike između struktura navedenih izoenzima. Uspoređena je i struktura enzima MAO A iz čovjeka sa strukturom MAO A izoliranom iz štakora te su ustanovljene razlike koje enzim posjeduje u različitim vrstama. Enzim monoamin-oksidaža B i monoamin-oksidaža A izolirana iz štakora kristaliziraju u obliku dimera, dok je ljudska monoamin-oksidaža A monomer^[5] prikazano na slici 5.



Slika 4. Strukture izoenzima monoamin-oksidaze. A) ljudska monoamin-oksidaza B u obliku dimera. Može se primijetiti da su obje podjedinice dimera gotovo identične. B) ljudska monoamin-oksidaza A u obliku monomera, C) monoamin-oksidaza A izolirana iz mitohondrija štakora. Uočljive su razlike između pojedinim izoenzima MAO A i MAO B izoliranih iz ljudskog organizma te razlika u MAO A između različitih vrsta, čovjeka i štakora. MAO A u čovjeku prisutna je u obliku monomera dok je MAO B prisutna u obliku dimera što čini glavnu razliku među izoenzimima MAO u ljudskom organizmu. Slika je preuzeta iz rada "Hydrogen Peroxide Produced by Mitochondrial Monoamine Oxidase Catalysis: Biological Implications" i doradena.

Dimer MAO B iz čovjeka proučavan *in vitro* pojavljuje se u dvije kristalne forme: triklinska i ortorombska kristalna forma te je ustanovljeno da je MAO B i u *in vivo* uvjetima prisutan u obliku dimera^[7]. Struktura enzima MAO B prikazana je na slici 6. gdje se može uočiti da je enzim građen od dva identična monomera nazvanih A i B.



Slika 5. Struktura enzima monoamin-oksidaze B. Na slici su prikazana dva identična monomera enzima koja su nazvana monomer A i monomer B te zajedno čine dimer MAO B.

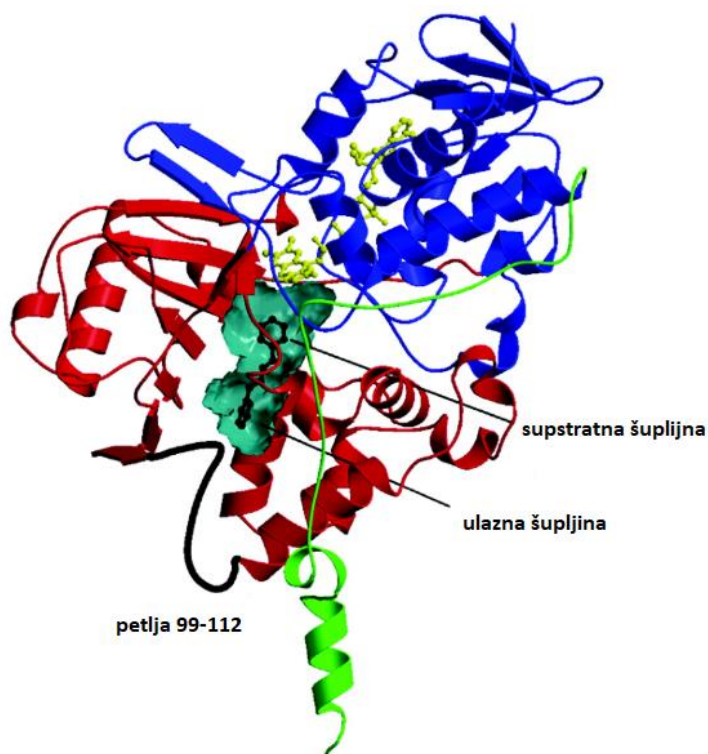
Crvenom bojom je označen dio enzima koji je slobodan u citosolu, zelenom bojom transmembranski segment i žutom bojom kofaktor FAD. b) Prikazan je segment koji čini transmembransku zavojniciu kojom je enzim vezan za vanjsku membranu mitohondrija i usidren u organel. c) Izdvojena jedna podjedinica dimera MAO B s označenim N i C krajem enzima. Označena je petlja 99/102 koja se smatra odgovornom za prijenos supstrata do aktivnog mjesta. Plavom bojom je označena ulazna šupljina koja se nalazi odmah pored petlje 99/102. Slika je preuzeta iz izvora "Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders": i dorađena.

Enzimi monoamin-oksidaza A i B u sisavaca, vezani su za vanjsku membranu mitohondrija preko C-kraja polipeptidnog lanca enzima ^[7] dok je ostatak enzima slobodan u citosolu. U ljudskoj monoamin oksidazi B koja je građena od ukupno 520 aminokiselina koje su posložene tako da je kvaterna struktura enzima vrlo kompaktna, aminokiseline 461-520 su zaslužne za vezanje enzima za vanjsku mitohondrijsku membranu te je analizom aminokiselinskog slijeda te sekvence ustanovljeno da aminokiseline 489-515 čine segment transmembranske α -zavojnice dugačke 27 aminokiselina ^[7], karakterističan motiv za sidrenje proteina u membrane što je prikazano na slici 5.b.

Uz interakcije C-kraja enzima i vanjske mitohondrijske membrane uočene su dodatne regije enzima koje potencijalno sudjeluju u vezanju enzima za membranu. U segmentu od 481. do 488. aminokiseline koji prethodi α -zavojnici na C-kraju pronađene su hidrofobne aminokiseline Phe481, Leu482, Leu486 i Pro487 koje su orijentirane direktno prema membrani te bi mogle

doprinijeti vezanju enzima za membranu hidrofobnim interakcijama. Također, na kraju petlje 99-112 (prikazana na slici 5.c) koja se nalazi blizu mjesta vezanja za membranu opažene su aminokiseline Pro109 i Ile110 u orijentaciji povoljnoj za ostvarivanje interakcija s membranom ^[7]. Upravo izloženost tih hidrofobnih aminokiselina prema vanjskoj membrani potvrđuje pretpostavku da vezanje enzima za membranu nije postignuto isključivo preko C-terminalne α -helikalne/ transmembranske domene enzima.

Aktivno mjesto, katalitičko vezno mjesto u koje se veže supstrat, formirano je u obliku plosnate/ravne šupljine približnog volumena 420 Å te je građeno od hidrofobnih i alifatskih aminokiselina koje osiguravaju hidrofobnu okolinu potrebnu za pristup i vezanje supstrata ^[7]. Uz šupljinu koja odgovara aktivnom mjestu enzima smještena je manja hidrofobna šupljina volumena 290 Å koju čine sljedeće aminokiseline: Phe103, Pro104, Trp119, Leu164, Phe168, Leu171, Ile199, Ile316 i Tyr326 ^[7]. Šupljina je odvojena od aktivnog mjesta preko četiri hidrofobne aminokiseline Tyr326, Ile199, Leu171 i Phe168, a petlja 99-112 odvaja je od otapala ^[7]. Ta šupljina nazvana je i ulaznom šupljinom (engl. *entrance cavity*), te se smatra ključnom za katalitičku aktivnost enzima. Na temelju definirane strukture pretpostavljen je mehanizam vezanja supstrata u aktivno mjesto koji započinje pomicanjem petlje 99-112 kako bi supstrat mogao ući u ulaznu šupljinu te se u vrlo kratkom vremenu ostvaruju konformacijske promjene (pomicanje četiri aminokiseline koje odvajaju ulaznu šupljinu od aktivnog mjesta) koje omogućuju difuziju supstrata do aktivnog mjesta pri čemu je izmjerena udaljenost između ulazne šupljine i flavinske domene (prikazano na slici 7.) i iznosi 20 Å ^[7]. S obzirom na položaj petlje 99-112 koja je smještena pored membranske domene (domene vezanja enzima za membranu) ustanovljeno je da supstrat mora pristupiti katalitičkom mjestu enzima sa strane vanjske membrane. Ulazna mjesta za supstrat nalaze se na površini vanjske membrane, a supstrat i flavin-vezne domene u vodenoj okolini dok kanali kojima kisik ulazi do veznih mjesta nisu poznati ^[7].



Slika 6. 3D struktura jedne podjedinice enzima MAO B s naznačenim domenama. Ulazna šupljina i šupljina za supstrat vrlo su blizu, a petlja 99-112 nalazi se s donje strane u odnosu na obje šupljine te je zaslužna za dolazak supstrata u aktivno mjesto. Zelenom bojom je označena transmembranska α -zavojnica kojom je enzim vezan za membranu, žuto i modelom "štapići i kuglice" označen je kofaktor FAD. Slika je preuzeta s web-stranice (https://en.wikipedia.org/wiki/Monoamine_oxidase_A) i dorađena.

Model vezanja supstrata u aktivno mjesto enzima detaljnije objašnjava interakcije i položaj supstrata u aktivnom mjestu što je od velike važnosti za razumijevanje strukture i katalitičkog mehanizma samog enzima. S tim interesom proučeno je vezanje supstrata benzilamina u aktivno mjesto MAO B. Opaženo je da se ugljikov atom ($C\alpha$ -atom) koji podilazi oksidaciji nalazi na vrlo maloj udaljenosti 3,6 Å od dušikovog atoma na položaju 5 (N-5) prostetičke skupine flavin-adenin-mononukleotid te da je orijentacija aromatskog prstena FAD ograničena i uvjetovana oblikom aktivnog mjesta (ravna šupljina) ^[7]. Uočeno je da se benzilamin sukladno spomenutim ograničenjima veže između fenolnih skupina (bočnih ogranaka) Tyr398 i Tyr435, zaključeno je da Tyr398, Tyr435 i flavin tvore tzv. aromatski kavez koji osigurava prepoznavanje amino-skupine odnosno supstrata enzima MAO te je utemeljeno da zbog

neopaženih elektrostatskih interakcija prilikom vezanja supstrata MAO veže supstrate u deprotoniranom obliku ^[7]. Volumen supstrata benzilamina (160 \AA^3) koji je puno manji od volumena aktivnog mjesta (420 \AA^3) ukazuje na mogućnost vezanja supstrata različitih oblika i veličina.

2.1.3. Supstratna specifičnost monoamin-oksidaza

Osnovna razlika između izoenzima MAO A i MAO B jest u njihovoj supstratnoj specifičnosti. Unatoč vrlo visokoj sličnosti u identičnosti primarnoj sekvenci od čak 70 %, specifičnost prema supstratima, a samim time i prema inhibitorima se znatno razlikuje. Opažena je različita osjetljivost enzima MAO A i MAO B na inhibitore klogilin i *L*-deprenil (selegilin), na temelju čega su razlikovani i ustanovljeno je da vrlo niske koncentracije klogilina inhibiraju enzim MAO A, dok vrlo niske koncentracije *L*-depenila (selegilina) inhibiraju enzim MAO B. Sama supstratna specifičnost posljedica je strukture i građe aktivnog mjesta enzima MAO A i MAO B. Za enzim MAO A ustanovljeno je da preferira veće i endogene supstrate poput serotonina, dok MAO B preferira male egzogene supstrate poput benzilamina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) i 2-feniletilamina ^[7]. Uspoređivanjem oblika i građe aktivnog mjesta MAO A i MAO B otkrivene su razlike u aminokiselinskom sastavu pri čemu su tri od četiri različite aminokiseline one koje odvajaju ulaznu šupljinu od aktivnog mjesta. Razlike su navedene redom: MAO B/MAO A : (Leu171/Ile180), (Cys172/Asn181), (Ile199/Phe208), (Tyr326/Ile335) ^[7]. Zbog različitih oblika i duljina bočnih ogranaka navedenih aminokiselina te steričkih efekata između ulazne šupljine i aktivnog mjesta jasno je da će i aktivno mjesto te ulazna šupljina biti različitih oblika i veličina kod oba enzima što omogućuje vezanje različitih supstrata u njihova aktivna mjesta te se smatra glavnim uzrokom specifičnosti prema supstratu.

Postoje supstrati koje MAO A i MAO B oksidiraju gotovo jednako djelotvorno; dopamin, noradrenalin, adrenalin, triptamin i tiramin. Ne razlikuju ih kao što razlikuju na primjer serotonin i MPTP. Ta specifičnost odnosno nespecifičnost prema supstratu objašnjena je pomoću kinetičkih parametara K_m Michaelisove konstante, V_{max} , maksimalne brzine reakcije i njihovim omjerom koji se nalaze u Tablici 1. Svi kinetički parametri vrijede za Michaelis-Mentenin model. Michaelisova konstanta definira se kao ona koncentracija supstrata pri kojoj je postignuta polovica maksimalne brzine reakcije, a njezina vrijednost govori o tome koliko čvrsto će enzim vezati supstrat, što je vrijednost K_m manja enzim će jače vezati supstrat. Moguće

je objasniti specifičnost ovih enzima i preko obrtnog broja koji se definira se kao broj molekula supstrata prevedenih u molekule produkta po molekuli enzima u jedinici vremena u uvjetima kada je enzim zasićen supstratom. Njegova vrijednost govori o tome koliko je pojedini enzim katalitički efikasan, što je ona veća enzim je efikasniji. Ovi parametri se najbolje mogu objasniti na primjeru supstrata 2-feniletilamina navedeni u tablici 1. Uspoređuju se vrijednosti K_m , V_{max} i njihov omjer za oba izoenzima MAO A i MAO B u ovisnosti o supstratima. U slučaju 2-feniletilamina vrijednost K_m je puno manja za MAO B iz čega se zaključuje da enzim veže supstrat (2-feniletilamin) pri puno nižim koncentracijama supstrata, konkretno $4 \mu\text{mol dm}^{-3}$ dok MAO A veže supstrat tek pri $140 \mu\text{mol dm}^{-3}$ te da će MAO B puno bolje katalizirati reakciju oksidativne deaminacije 2-feniletilamina, nego što bi to radio MAO A. Vrijednost V_{max} puno je veća za izoenzim MAO B i iznosi $309 \text{ pmol min}^{-1}$ po mg proteina što znači da će u 1 minuti nastati 309 pmol produkta po mg proteina, a u slučaju kada bi MAO A katalizirala oksidaciju 2-feniletilamina u 1 minuti nastaje samo 20 pmol produkta po mg proteina. Obrtni broj za MAO B bi bio puno veći nego za MAO A što ukazuje na to da je reakcija oksidativne deaminacije 2-feniletilamina katalitički efikasnija ako je katalizirana enzimom MAO B. Iz svih navedenih parametara zaključuje se da iako enzimi MAO A i MAO B kataliziraju istu kemijsku reakciju posjeduju različitu specifičnost prema supstratima. Na primjeru dopamina može se zaključiti da će i MAO A i MAO B katalizirati reakciju oksidativne deaminacije dopamina jednakom učinkovitošću s obzirom na vrlo slične vrijednosti za K_m i V_{max} .

Tablica 1. Supstratna specifičnost monoamin-oksidaza u cerebralnom korteksu⁵. Tablica je preuzeta iz rada "The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors" i dorađena.

| supstrat | MAO A | | | MAO B | | |
|---------------------|-------------------------------|--|-----------------|-------------------------------|--|-------------------|
| | $K_m / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | $V_{max} / \text{pmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ | V_{max}/K_m | $K_m / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | $V_{max} / \text{pmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ | V_{max}/K_m |
| adrenalin | 125 ± 42 | 379 ± 54 | 3.03 ± 1.11 | 266 ± 9 | 465 ± 61 | 1.75 ± 0.23 |
| dopamin | 212 ± 33 | 680 ± 123 | 3.21 ± 0.77 | 229 ± 33 | 702 ± 158 | 3.07 ± 0.82 |
| 5-hidroksitriptamin | 137 ± 24 | 228 ± 31 | 1.66 ± 0.37 | 1093 ± 20 | 6.6 ± 1.3 | 0.003 ± 0.001 |
| noradrenalin | 284 ± 17 | 561 ± 42 | 1.98 ± 0.19 | 238 ± 30 | 321 ± 13 | 1.35 ± 0.18 |
| 2-feniletilamin | 140 ± 22 | 20 ± 8 | 0.14 ± 0.06 | 4 ± 2 | 309 ± 24 | 77.3 ± 39.1 |
| triptamin | 35 ± 6 | 58 ± 5 | 1.66 ± 0.32 | 35 ± 8 | 108 ± 2 | 2.84 ± 0.60 |
| tiramin | 127 ± 18 | 182 ± 28 | 1.43 ± 0.30 | 107 ± 21 | 343 ± 48 | 3.21 ± 0.77 |

§ 3. PATOGENEZA PARKINSONOVE BOLESTI

Parkinsonova bolest je vrlo teška progresivna bolest središnjeg živčanog sustava od koje boluje otprilike 7 milijuna ljudi u svijetu ^[8]. Simptomi bolesti variraju od pojedinaca, ali najkarakterističniji su tremori, otežano i usporeno pokretanje tijela, gubitak elastičnosti mišića (rigidnost mišića), otežane ekspresije lica te promjene govora, a u kasnijim fazama moguća je i pojava depresije, anksioznosti i učestalih promjena raspoloženja ^[8]. Iako nema univerzalnog i točnog uzroka bolesti, odnosno on još nije otkriven, postoje mnogi čimbenici koji doprinose razvoju i progresiji Parkinsonove bolesti. U nekoliko slučajeva pronađene su genetske mutacije koje bi mogle uzrokovati bolest, no razvoj bolesti uzrokovan genetskim mutacijama ^[1] još se istražuje i smatra se vrlo rijetkom pojavom. Utjecaj okoline u smislu izlaganja različitim kemikalijama i toksinima također se opisuje kao mogući čimbenik razvoja Parkinsonove bolesti. Neke studije pronašle su poveznicu između izloženosti pesticidima i Parkinsonove bolesti od kojih je najpoznatija Tajvanska studija koja tvrdi da je izloženost herbicidu parakvatu u trajanju od približno 20 godina povezana s Parkinsonovom bolešću ^[1].

Ustanovljeno je da češće obolijevaju muškarci stariji od 60 godina što pokazuje da je bolest ovisna i o dobi i spolu. U Hrvatskoj je 2016. godine zbog Parkinsonove bolesti umrlo 372 osoba, od toga 200 osoba muškog spola, a 172 osoba ženskog spola ^[9].

3.1.1. Oksidativni stres u Parkinsonovoj bolesti

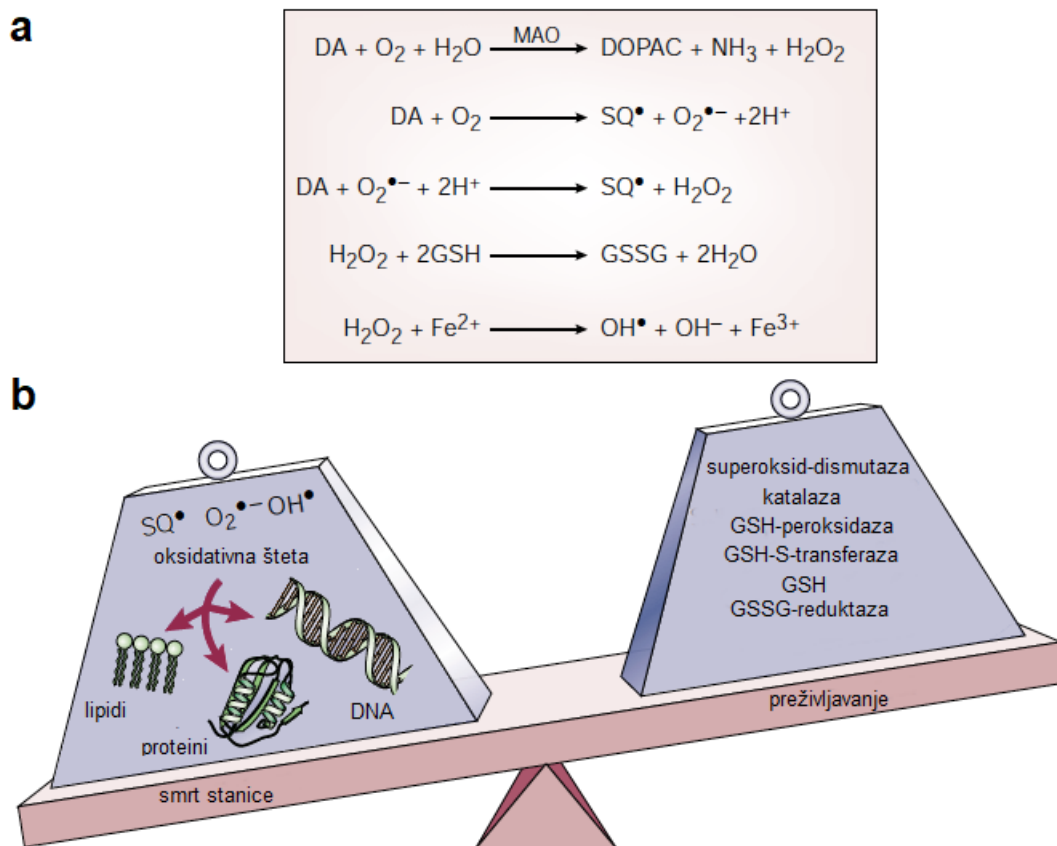
Oksidativni stres je stanje uzrokovano nedovoljnim uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta koje nastaju u raznim biokemijskim procesima. U normalnim uvjetima te reaktivne kisikove vrste uklanjaju se pomoću specifičnih enzima superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze, GSSG-reduktaze, glutation-S-transferaze i katalaze čije su reakcije prikazane na slici 7. i opisane u opisu slike. Smatra se da oksidativni stres uzrokovan metabolizmom dopamina pridonosi razvoju i nastanku Parkinsonove bolesti te ostalih neurodegeneracijskih bolesti. Reaktivne vrste koje nastaju u metabolizmu dopamina, reakcijama enzimske razgradnje pomoću MAO te neenzimatskim reakcijama autooksidacije dopamina su vrlo opasne. Autooksidacijom dopamina pri fiziološkom pH nastaju toksične dopamin-kinonske vrste, superoksidni radikali te vodikov peroksid ^[1], dok enzimskom razgradnjom dopamina koja je

detaljno opisana u poglavlju 2. nastaju netoksična vrsta DOPAL koja se može oksidirati do DOPAC (3,4-dihidroksifenilacetene kiseline) i vodikov peroksid. Vodikov peroksid kao što je ranije spomenuto može nespecifično oksidirati razne biološke molekule poput proteina i Fentonovom reakcijom proizvesti hidroksilne radikalne vrste što može dovesti do strašnih posljedica od kojih je krajnja smrt neurona odnosno apoptoza. Superoksid koji nastaje također nije jako reaktivna molekula, ali može se prevesti u vodikov peroksid djelovanjem enzima superoksid-dismutaze ili u vrlo reaktivne peroksonitritne radikalne vrste u prisutnosti dušikovog (II) oksida, NO^[1]. Nastale reaktivne kisikove vrste oštećuju proteine, DNA, lipide i ostale važne biološke molekule koje su neophodne za normalan razvoj i funkcionalnost svih stanica u ljudskom organizmu. Oštećenje lipida može dovesti do pojave ekscitotoksičnosti (oštećenja i odumiranja živčanih stanica uslijed pretjerane stimulacije neuroprijenosnicima poput glutamata)^[10] koja se javlja kao posljedica povećane propusnosti/permeabilnosti staničnih membrana za ione poput Ca²⁺ koji su vrlo važni sekundarni glasnici u prijenosu signala.

U Parkinsonovoj bolesti stanice *substantie nigre* tzv. crna jezgra, podvrgnute su vrlo visokoj razini oksidativnog stresa što je opaženo povećanim stvaranjem nusprodukata oksidacije proteina, lipida i DNA molekula^[1]. Opaženo je da su koncentracije malondialdehida (malonskog dialdehida) i lipidnih hidroperoksida (tvari koje se koriste kao markeri/označivači za oksidirane lipide) otprilike deset puta veće kod oboljelih od Parkinsonove bolesti u odnosu na zdravu populaciju. Imunocitokemijskom detekcijom 8-hidroksigvanozina opažen je značajan porast tog spoja u neuronima *substantie nigre* kod osoba oboljelih od Parkinsonove bolesti što također potvrđuje povezanost oksidativnog stresa i Parkinsonove bolesti. Znanstvena istraživanja temeljena na toksinu 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinu poznatom pod nazivom MPTP pokazala su da aktivni metabolit spoja MPTP-a, MPP⁺ dovodi do smanjenja nigralnih neurona *substantie nigre* i uzrokuju simptome koji su vrlo slični simptomima Parkinsonove bolesti^[1]. Pretpostavlja se da MPP⁺ inhibira kompleks I (NADH-Q-oksidoireduktaza) u mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona i ima visoki afinitet prema VMAT2 : vezikularni monoaminski transporter 2 što mu omogućuje ulazak u dopaminergičke vezikule^[1]. Inhibiranjem kompleksa I u lancu prijenosa elektrona gubi se veliki dio proton-motorne sile potrebne za stvaranje protonskog gradijenta za sintezu ATP-a što posljedično dovodi do manje količine energije dostupne stanicama i onemogućuje njihov normalni rast i razvoj. Predloženo je i objašnjenje kojim MAO inhibira lanac prijenosa elektrona. Naime, u

reakciji kataliziranoj monoamin-oksidazom nastaje H_2O_2 koji se u mitohondriju uklanja prvenstveno pomoću glutation-peroksidaze pri čemu nastaje glutation-disulfid GSSG kao što je već spomenuto u prethodnim odlomcima. Uklanjanje vodikovog peroksida nužno je za sprječavanje razvoja oksidativnog stresa, no ako se GSSG gomila u stanici on može spontano ili enzimski reagirati s dostupnim proteinima i napraviti protein miješane disulfide Pr-SSG u reakciji kataliziranoj tiol-transferazom ili tioredoksinom ^[11]. U slučaju kada je jedan od tih proteina neki protein iz ciklusa limunske kiseline koji ima modificiranu katalitički aktivnu SH-skupinu to dovodi do inaktivacije enzima i inhibicije ciklusa limunske kiseline i posljedično lanca prijenosa elektrona.

Izloženost kemikalijama iz okoline smatra se važnim čimbenikom koji doprinosi razvoju Parkinsonove bolesti te su istraživanja pokazala da pesticidi poput rotenona i već spomenutog parakvata inhibiraju kompleks I mitohondrijskog respiratornog lanca (lanca prijenosa elektrona) koji je vrlo važan dio u sintezi ATP-a, temeljnog oblika energije za sve žive stanice. Smatra se da MPP⁺ i parakvat zbog svoje strukturne sličnosti ulaskom u sinaptičke vezikule mogu poremetiti razinu dopamina ^[1] te tako povećati mogućnost nastajanja oksidativnog stresa.



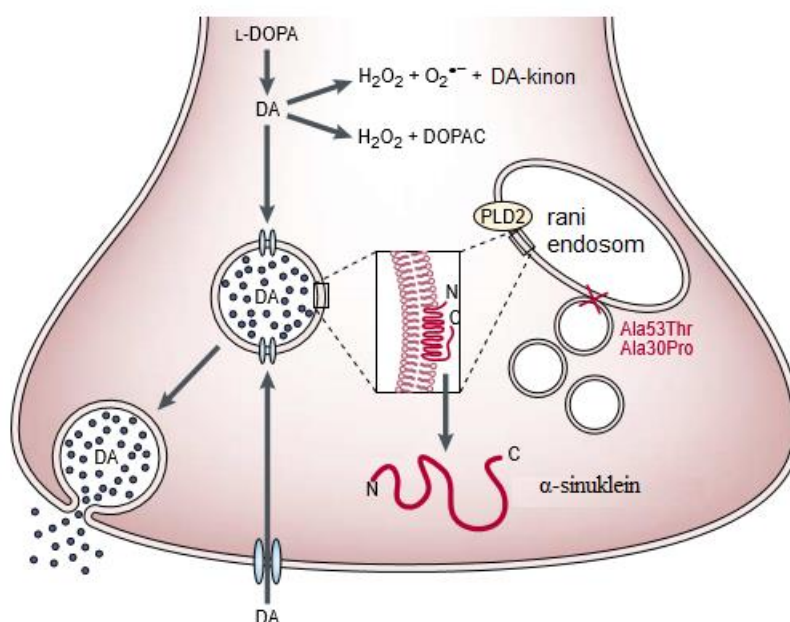
Slika 7. Oksidativni stres.

A) Reakcije dopamina (DA) s različitim kemijskim vrstama pri čemu nastaju reaktivne kisikove vrste opasne za organizam. Prikazane su i reakcije uklanjanja vodikova peroksida pomoću glutathion-peroksidaze i Fentonova reakcija (zadnji red). B) Prikaz neravnoteže između uklanjanja vodikova peroksida iz stanice pomoću enzima superoksid-dismutaze, katalaze, GSH-peroksidaze, GSH-S-transferaze, glutathiona i GSSG-reduktaze i stvaranja reaktivnih kemijskih vrsta koje reagirajući nespecifično s lipidima, proteinima i molekulama DNA uzrokuju smrt stanice. B) Shematski prikaz neravnoteže između nastajanja opasnih reaktivnih kemijskih vrsta i neuklanjanja istih iz stanice što vodi k smrti stanice.

Slika je preuzeta iz rada "Pathogenesis of Parkinson's disease: Dopamine vesicles and α -synuclein" i dorađena.

3.1.2. α -sinuklein i parkin

α -sinuklein je mali protein građen od 140 aminokiselina koji je kodiran genom SNCA, a nalazi se u vrlo velikim količinama u mozgu te je nađen u puno manjim količinama u srcu, mišićima i drugim tkivima ^[12]. U mozgu se nalazi na presinaptičkim krajevima neurona koji su zaslužni za otpuštanje kemijskih glasnika, neuroprijenosnika iz sinaptičkih vezikula te je zaslužan za održavanje optimalne razine sinaptičkih vezikula i otpuštanje dopamina ^[12]. 50 % proteina asocirano je za membranu neurona dok je ostalih 50% slobodno u citosolu pri čemu se N-terminalna i C-terminalna skupina nalaze na citosolnoj strani što se može vidjeti na slici 8. Smatra se da je glavna uloga α -sinukleina regulacija stvaranja sinaptičkih vezikula. α -sinuklein modulira aktivnost enzima fosfolipaze D koji hidrolizira fosfolipide poput fosfatidilkolina u plazma membranama te je potencijalno važan za recikliranje vezikula ^[1]. Važnost sinaptičkih vezikula očituje se u skladištenju citosolnog dopamina koji ukoliko nije pohranjen može stvarati reaktivne vrste štetne za stanice kao što je opisano u prethodnim poglavljima. Sinaptičke vezikule osiguravaju povoljne uvjete za pohranu dopamina, uvjeti niske pH vrijednosti i izostanak enzima MAO pružaju sigurnu okolinu za dopamin ^[1]. Smatra se da je gubitak funkcije α -sinukleina povezan s porastom oksidativnog stresa te se objašnjava nekoliko mehanizama koji vode gubitku njegove funkcije i doprinose razvoju Parkinsonove bolesti.

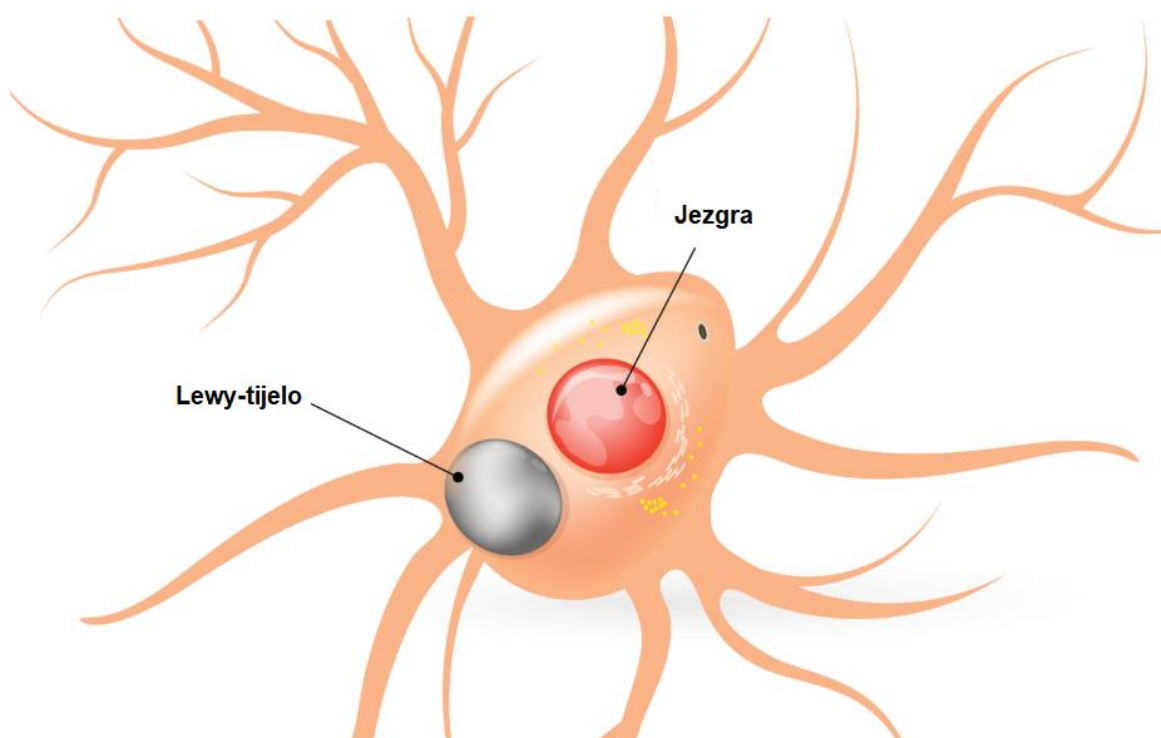


Slika 8. Nastanak vezikula koje skladište dopamin u neuronima. Prikazan je uvećani dio membrane vezikule gdje se može uočiti položaj α -sinukleina u membrani: N i C terminalni dio su na citosolnoj strani, a transmembranski dio je usidren u membranu vezikule. Na isti način je α -sinuklein smješten u presinaptičkim krajevima neurona. Slika je preuzeta iz rada "Pathogenesis of Parkinson's disease: Dopamine vesicles and α -synuclein" i dorađena.

Prilikom vezanja za fosfolipidnu membranu α -sinuklein mijenja svoju sekundarnu strukturu nasumičnog klupka u uređenu 83% α -zavojnicu ^[1]. Mutacija Ala30Pro sprječava sposobnost vezanja α -sinukleina za male vezikule uzrokovanu malom strukturnom promjenom, a mutacija Ala53Thr onemogućuje vezanje proteina za planarne lipidne membrane ^[1] što je prikazano na slici 8. Smatra se da navedene mutacije onemogućuju regulaciju stvaranja sinaptičkih vezikula od ranog endosoma što doprinosi smanjenom broju vezikula koje su potrebne za pohranu citosolnog dopamina. Budući da je pohrana dopamina u vezikule način kojim se stanica štiti od reaktivnih vrsta nastalih metabolizmom dopamina, mutacije α -sinukleina uzrokuju nakupljanje dopamina u citosolu te razmjerno povećavaju vjerojatnost oksidativnog stresa uzrokovanog dopaminom i vode odumiranju dopaminergičnih neurona koji se ne mogu regenerirati što uzrokuje smanjenu proizvodnju dopamina.

3.1.3. Lewy-tijelo

Druga pretpostavka koja objašnjava gubitak funkcije α -sinukleina jest stvaranje protofibrila α -sinukleina u *Lewy-tijelima* ili tzv. agregiranje α -sinukleina koje je posljedica nastanka reaktivnih kisikovih vrsta. Patološki biljeg Parkinsonove bolesti, *Lewy tijelo* je okrugla eozinofilna nakupina pronađena u somi i neuritima pojedinih neurona, a posebno u dopaminergičnim neuronima u *substantii nigri* ^[1] te je prikazano na slici 9. Lewy-tijela po svom sastavu su proteini, sadrže filamente α -sinukleina dugačke 200-600 nm, promjera 5-10 nm te nekoliko drugih proteina poput ubikvitina-proteina koji sudjeluje u razgradnji pogrešno smotanih i oštećenih proteina, podjedinica proteasoma, HSP (*heat shock* proteina) i neurofilamenata ^[1]. Ustanovljeno je da pri velikim koncentracijama α -sinuklein ima tendenciju stvaranja oligomernih β -ploča nazvanih protofibrili za koje je otkriveno da imaju toksični efekt te da mutacije gena PARK1, koje podrazumijevaju supstituciju jedne aminokiseline drugom, Ala30Pro i Ala53Thr povećavaju tendenciju stvaranja protofibrila α -sinukleina. Pretpostavlja se da protofibrili α -sinukleina vezanjem za sinaptičke vezikule povećavaju razinu dopamina u citosolu na način da uzrokuju propuštanje sinaptičkih vezikula što vodi porastu oksidativnog stresa i konačno odumiranju stanica neurona (nakon niza reakcija reaktivnih vrsta i proteina, lipida i DNA molekula). Opaženo je i da dopamin-kinonske vrste nastale autooksidacijom dopamina stvaraju kovalentne adukte s α -sinukleinom te na taj način inhibiraju stvaranje fibrila iz protofibrila koji su toksični oblici α -sinukleina što ponovno vodi porastu razine dopamina u citosolu, oksidativnom stresu uzrokovanom dopaminom i smrti odnosno apoptozi neurona.



Slika 9. Građa Lewy-tijela, okrugla eozinofilna nakupina sastavljena u najvećoj mjeri od α -sinukleina. Smještena je u blizini jezgre neurona. Slika je preuzeta s web stranice

<https://alzheimersnewstoday.com/2014/12/03/new-insights-into-dementia-with-lewy-bodies-parkinsons-disease/>

i dorađena.

§ 4. INHIBITORI MONOAMIN-OKSIDAZE I PRISTUP LIJEČENJU PARKINSONOVE BOLESTI

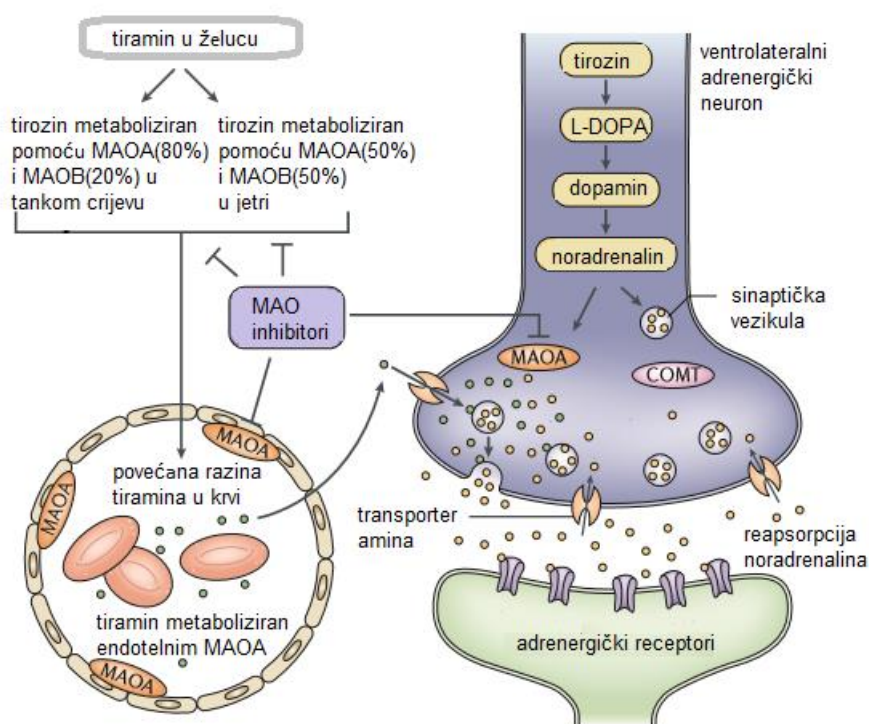
Početak proučavanja enzima monoamin-oksidaze počinje 1928. godine kada je znanstvenica Mary Hare-Bernheim opisala enzim koji katalizira oksidativnu deaminaciju tiramina i nazvala ga tiramin oksidaza, a kasnije je Hugh Blaschko utvrdio da taj isti enzim katalizira oksidativnu deaminaciju tiramina, noradrenalina i alifatskih amina te je naziv promijenjen u monoamin-oksidaza, a konačno ime mitohondrijska monoamin-oksidaza dodijelio je znanstvenik Zeller^[3]. S obzirom na veliki značaj enzima interes znanstvenika bio je značajan te su ubrzo nakon

njegovog otkrića otkriveni i razni inhibitori monoamin-oksidade od kojih je prvi iproniazid, lijek koji se koristio u liječenju tuberkuloze te je našao svoju primjenu i kao antidepresiv. Navodi se kao prvi inhibitor MAO koji se uspješno primjenio u terapiji za depresivne bolesti te jedan od prvih psihotropnih lijekova koji su se uopće primijenili u terapijske svrhe^[3]. Otkriće iproniazida motiviralo je znanstvenike u pronalaženju ostalih inhibitora MAO koji bi mogli biti potencijalni lijekovi za razne depresivne i neurodegeneracijske bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te je u narednih godina otkriven velik broj inhibitora MAO s potencijalnom terapijskom primjenom. Početkom 1960-ih godina efikasnost iproniazida kao antidepresiva narušena je otkrićem ozbiljnih nuspojava poput oštećenja jetre koje se smatrao posljedicom prisutnosti otrovnog hidrazina u strukturi iproniazida. Taj problem otklonjen je razvojem novih inhibitora koji ne sadrže hidrazin u svojoj strukturi, no novi inhibitori poput tranilcipromina uzrokovali su nove nuspojave od kojih je najpoznatija nuspojava tzv. *cheese efekt*^[3]. Daljnim razvojem i proučavanjem enzima MAO otkriveni su mnogu specifični i nespecifični inhibitori MAO koji su pronašli primjenu u liječenju Parkinsonove bolesti od kojih su svakako najvažniji *L*-deprenil, rasagilin i pargilin.

4.1.1. Cheese efekt

Tijekom otkrića i razvoja inhibitora MAO mnogi inhibitori koji su se primjenjivali u terapijske svrhe imali su negativne nuspojave zbog kojih su privremeno odbačeni kao mogući lijekovi za razne depresivne bolesti, Parkinsonovu bolest, Alzheimerovu bolest i razne druge neurološke bolesti i stanja. Najpoznatija nuspojava poznata pod nazivom *cheese efekt* dobila je ime po aminima koji su prisutni u nekim vrstama sira i fermentiranim pićima poput piva i nekih vina, a čija prisutnost u organizmu, u uvjetima kada nije moguća njihova razgradnja, može dovesti do ozbiljnih posljedica. U normalnim uvjetima ti amini, od kojih je najčešći tiramin, razgrađuju se u želučanoj stijenci i jetri pod djelovanjem monoamin-oksidade A i B te u vaskularnim endotelnim stanicama i plućima ukoliko nisu razgrađeni u želudcu i jetri^[3]. Ireverzibilni inhibitori MAO A onemogućuju razgradnju tiramina i ostalih amina unesenih prehranom u probavnom procesu te oni krvotokom dolaze do adrenergičkih receptora koji se nalaze na površini neurona i vezanjem na odgovarajuće receptore uzrokuje povećano izlučivanje noradrenalina iz neurona što dovodi do povećane hipertenzije koja u nekim slučajevima može biti i letalna. Iz tog razloga su mnogi inhibitori MAO koji su bili

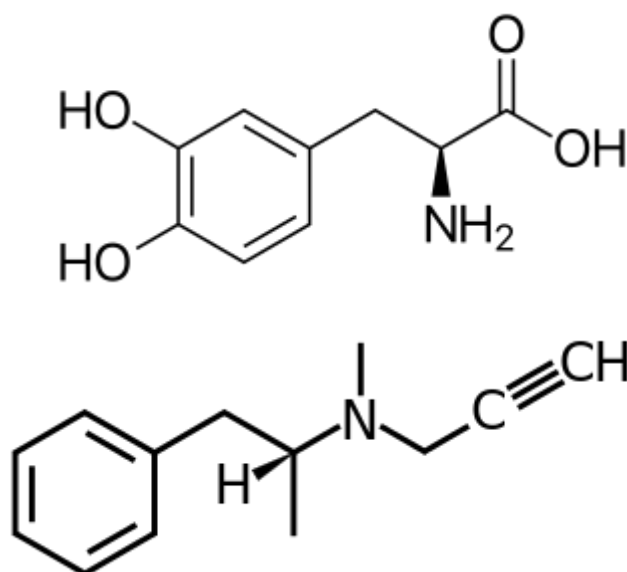
primjenjivani u liječenju depresivnih bolesti odbačeni te je pao interes za proučavanje i razvoj novih inhibitora, počela se razmatrati zamjena MAO inhibitora sa tricikličkim antidepressivima i Prozacom koji su se pokazali iznimno uspješnima, a nisu izazivali *cheese efekt*. Unatoč nezainteresiranosti/manjoj popularnosti neki znanstvenici nisu prestali istraživati inhibitore MAO te su došli do vrijednih zapažanja. Selektivni inhibitori MAO B pokazali su se uspješnima jer ne izazivaju reakciju sira, budući da je MAO B u crijevima prisutan u vrlo maloj količini, a tiramin se u crijevima prvenstveno razgrađuje pomoću MAO A tiramin će biti razgrađen i neće uzrokovati hipertenziju, a selektivni MAO B inhibitori će djelovati kao lijekovi bez teških nuspojava. Reverzibilni inhibitori MAO također ne uzrokuju reakciju sira jer njih tiramin može premjestiti s enzima MAO te se onda može normalno razgraditi. Na slici 10. prikazan je put kojim nerazgrađeni tiramin iz hrane povećava lučenje noradrenalina iz adrenergičkih neurona.



Slika 10. Mehanizam uzrokovanja hipertenzije (kardiovaskularnog efekta) tiraminom. Neaktivnost enzima MAO A i MAO B dovodi do gomilanja tiramina i njegovog izlučivanja u krvi što vodi do ozbiljnih posljedica. Slika je preuzeta iz rada "The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors" i dorađena.

4.1.2. *L-deprenil i rasagilin – ireverzibilni inhibitor MAO B*

L-deprenil ili *selegilin*, derivat *proparglamina* je selektivni inhibitor monoamin-oksidade B koji pri manjim koncentracijama inhibira oksidativnu deaminaciju dopamina, feniletilamina i benzilamina, ali pri većim koncentracijama gubi selektivnost i postaje inhibitor i MAO A [3].³ Smatrao se kao dobar izbor za liječenje depresije i Parkinsonove bolesti, ali nije korišten kao takav godinama, već se primjenjivao prvenstveno u istraživanjima funkcije enzima MAO B. Na temelju mnogih eksperimenata provedenih s *L-deprenilom* Peter Riederer je tražeći neki inhibitor MAO koji ne uzrokuje *cheese efekt*/učinak sira odlučio da je *L-deprenil* najbolji izbor za dodatak terapiji pacijentima koji su liječeni pomoću *L-DOPE*. *L-deprenil* je izabrao jer bazalni gangliji u ljudskom mozgu sadrže MAO B u većoj količini nego MAO A. Nakon prvog kliničkog ispitivanja terapije *L-DOPE* u kombinaciji s *L-deprenilom* provedenog na ukupno 47 pacijenata koje se pokazalo uspješnim, te nije zapažena pojava *cheese efekta* ni kod jednog pacijenta, uslijedila su mnoga ispitivanja koja su pokazala da je *L-DOPA* u kombinaciji s *L-deprenilom* uspješna terapija za pacijente oboljele od Parkinsonove bolesti te se počela primjenjivati u cijeloj Europi dok je u Americi prihvaćena tek nakon 15 godina kada je lijek dobio ime *selegilin*.



Slika 11. 3,4-dihidroksi-*L*-fenilalanin ili *L*-DOPA (gore) i *L*-deprenil poznat pod nazivom selegilin (dolje). Slika je preuzeta s web-stranice <https://sh.wikipedia.org/wiki/L-DOPA>: i obrađena.

L-3,4-dihidroksifenilalanin poznat pod imenom *L*-DOPA je prirodni suplement i psihoaktivni lijek koji se nalazi u nekim biljkama i hrani ^[3], a koristi se i u liječenju Parkinsonove bolesti. Sintetizira se iz aminokiseline *L*-tirozina te može proći krvno-moždanu barijeru gdje se u mozgu pomoću enzima DOPA-dekarboksilaza (DDC) prevodi u dopamin te na taj način povećava koncentraciju dopamina u mozgu što se koristi u liječenju Parkinsonove bolesti. Neuroptorekcija *L*-deprenila očituje se u tome što on štiti od toksičnosti MPP⁺ koji inhibira mitohondrijski lanac prijenosa elektrona, a što posljedično inhibira sintezu ATP-a.

Rasagilin ili azilect sistematsko ime (*R*)-*N*-(prop-2-inil)-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-amin je ireverzibilni inhibitor monoamin-oksidade B koji je otkriven kao *R*(+)-izomer spoja AGN 1133, derivata amioindan proparglamina, dok je *S*(-) izomer poznat pod imenom TVP1022 ^[3]. Najveća prednost rasagilina jest što nije derivat amfetamina i ne pokazuje simpatomimetičku aktivnost poput *L*-deprenila. Pokusima na primatima pokazano je da i selegilin i rasagilin povećavaju koncentraciju dopamina što je praćeno lokalnom infuzijom *L*-DOPE pomoću mikrodijalize. Rasagilin se primjenjuje u liječenju Parkinsonove bolesti i u monoterapiji i u kombinaciji s *L*-DOPOM, a studije su pokazale da pacijenti koji su podvrgnuti terapiji rasagilinom u ranijoj fazi bolesti pokazuju puno manji stupanj odbijanja lijeka u odnosu na pacijente koji s terapijom počinju šest mjeseci kasnije ^[3]. Mehanizam djelovanja rasagilina

temelji se na inhibiciji odnosno sprječavanju apoptoze (programirane stanične smrti). Smatra se da rasagilin i ostali derivati proparglamina uzrokuju povećanu ekspresiju antiapoptičkih gena Bcl-2 i Bcl-X1 te smanjuju proizvodnju Bad i Bax gena.

4.1.3. Selektivni reverzibilni inhibitori MAO-A u Parkinsonovoj bolesti i depresiji

Inhibitori MAO A nisu se proučavali u tolikoj mjeri kao inhibitori MAO B zbog tzv. *cheese reaction* koju su uzrokovali i zbog nedovoljne količine dokaza o utjecaju inhibitora MAO A na povećanje koncentracije dopamina u ljudskom mozgu. Napravljene su (posthumano) analize mozgova pacijenata koji su liječeni selektivnim inhibitorima MAO A klogilinom i selegilinom (inhibitor MAO B) te je opaženo da koncentracija dopamina nije značajno porasla, dok je koncentracija noradrenalina, serotonina i feniletilamina porasla u puno većoj mjeri [3]. Na temelju tih opažanja zaključeno je da dok je prilikom selektivne inhibicije jedan od izoenzima (npr. MAO A) u potpunosti inaktivan drugi (MAO B) i dalje metabolizira dopamin te ne dolazi do značajne promjene koncentracije dopamina u nigrostrijatalnim dopaminergičkim područjima mozga [3]. To je posljedica toga što je dopamin supstrat i MAO A i MAO B dok je npr. serotonin supstrat MAO A, a feniletilamin supstrat MAO B o čemu je detaljnije pisano u prethodnim poglavljima.

Razvojem reverzibilnih inhibitora MAO A poznatih pod imenom RIMA raste interes za proučavanjem inhibitora MAO A koji su se pokazali efikasnim u liječenju depresije i Parkinsonove bolesti kod pacijenata koji pokazuju simptome depresije. Najpoznatiji od reverzibilnih inhibitora MAO A jest moklobemid koji nije izazivao *cheese efekt* upravo zbog svojstva reverzibilnosti koje omogućuje da tiramin kompetira s moklobemidom za aktivno mjesto MAO A pri čemu je omogućena razgradnja tiramina i spriječena hipertenzija. Mikrodijalizom je pokazano da je nakon terapije moklobemidom ili klogilinom uočeno pojačano izlučivanje dopamina unatoč činjenici da se ravnotežna koncentracija dopamina gotovo ne mijenja zbog nespecifičnosti izoenzima MAO prema dopaminu [3]. S obzirom na uočene efekte moklobemid se počeo primjenjivati kao dodatak u terapiji L-DOPOM pri čemu su opažena poboljšanja posebno motornih funkcija kod liječenih pacijenata, no ostala poboljšanja su bila vrlo blaga što je vjerojatno posljedica premale doze lijeka koja je korištena u samim počecima njegove primjene ili reverzibilnosti inhibitora. Budući da se radi o

reverzibilnom inhibitoru dopamin može kompetirati s moklobemidom za aktivno mjesto MAO A i tako vezanjem za MAO A spriječiti inhibiciju moklobemidom što dovodi do smanjenje koncentracije dopamina dostupne za vezanje na receptore i obavljanje svoje funkcije. Da bi se nadišao taj problem reverzibilnosti sintetizirani su inhibitori s puno većim afinitetom prema MAO A u odnosu na dopamin poput brofaromina i befloksatona ^[3]. Moklobemid je pronašao puno bolju primjenu u liječenju depresivnih bolesti te se smatra jednim od prvih antidepresiva koji nije izazivao *cheese efekt* i dao izvrsne rezultate poput poboljšanja psihomotornih vještina, memorije i raznih kognitivnih funkcija. Česta je pojava simptoma depresije kod pacijenata koji boluju od Parkinsonove bolesti što ne iznenađuje s obzirom da su istraživanja pokazala smanjenje razine serotonina i noradrenalina ^[3] kod mnogih pacijenata te se moklobemid koristi kao antidepresiv i daje vrlo značajne pozitivne pomake.

§ 5. LITERATURNI IZVORI

- [1] P. Brundin, J. Lotharius, *Nature Reviews Neuroscience*, **3** (2002) 932-942.
- [2] <https://bs.wikipedia.org/wiki/Dopamin>. (preuzeto 18.svibnja 2019.)
- [3] Y. S. Bakhle, M. B. H. Youdim, *British Journal of Pharmacology*, **147** (2006) 287-296.
- [4] D. E. Edmondson, *Current Pharmaceutical Design*, **20** (2014) 155-160.
- [5] D. Edmondson, K. F. Tipton, M. B. H. Youdim, *Nature Reviews Neuroscience*, **7** (2006) 295-309.
- [6] C. Follmer, *Expert. Rev. Neurother.* **14(6)** (2014) 703-716.
- [7] C. Binda, D. E. Edmondson, F. Hubalek, A. Mattevi, P. Newton-Vinson, *Nature Structural Biology*, **9** (2002) 22-26.
- [8] <https://www.adiva.hr/zdravlje/zanimljivosti-i-savjeti> (preuzeto 26.svibnja 2019.)
- [9] <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/svjetski-dan-parkinsonove-bolesti/> (preuzeto 26. svibnja 2019.)
- [10] <https://bolerodrinks.com.hr/2018/01/30/monosodium-glutamat/> (preuzeto 26.svibnja 2019.)
- [11] G. Cohen, R. Farooqui, N. Kesler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (1997) 4890-4894.
- [12] <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SNCA>, (preuzeto 02.lipnja 2019.)
- [13] <https://sh.wikipedia.org/wiki/L-DOPA>, (preuzeto 02.lipnja 2019.)